

A dUTPáz magi importjának mechanizmusa és szabályozása, a sejtciklus függő magi proteóm újraépítésére való kitekintéssel

A doktori értekezés tézisei

Róna Gergely

Okleveles biológus



Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar
Biológia Doktori Iskola, Szerkezeti Biokémia Program

A doktori iskola vezetője:

Prof. Dr. Erdei Anna

A szerkezeti biokémia program vezetője:

Prof. Dr. Nyitrai László

Témavezető:

Prof. Dr. Vértessy G. Beáta

Készült:



a Magyar Tudományos Akadémia, Természettudományi Kutatóközpontjának, Enzimológiai
Intézetében

2015, Budapest

1. Bevezetés

A dUTPázok fontos szerepet töltenek be a genomi integritás megőrzésében mivel esszenciális komponensei a *de novo* timidilát bioszintézisnek. A dUTPázok által katalizált folyamat során a dUTP hidrolízisét követően dUMP és pirofoszfát keletkezik, ezáltal csökkentve az intracelluláris dUTP szintet, mellyel megelőzhető a DNS-beli uracil felhalmozódás. A dUTPáz hiánya vagy gátlása a dUTP/dTTP arányok jelentős eltolódását eredményezi, mely végső soron a DNS uracil tartalmának növekedéséhez vezet [1]. Mivel a *de novo* timidilát bioszintézis központi jelentőségű a dNTP háztartásban, ezért számos kemoterápiás ágens (fluoropirimidinek, anifolátok) célpontja. Ismert, hogy a dUTPáz depléción humán sejtekben jelentősen növelte azok érzékenységét fluoropirimidin kezelésekkel szemben, ezzel is alátámasztva a dUTPázok orvosi biológiai jelentőségét a rákellenes terápiákban [2]. Mind az embereknek, mind pedig az ecetmuslicának két dUTPáz izoformája ismert, melyek közül az egyik a sejtmagban található, míg a másik a mitokondriumokban (ember) vagy a citoplazmában (ecetmuslica). A magi izoforma intracelluláris elhelyezkedése konzisztens azzal, hogy a *de novo* timidilát bioszintézis csak a magban zajlik kellő hatékonysággal ahhoz, hogy meggátolja a genomi uracil felhalmozódást. Ezért az útvonal kulcsfontosságú enzimei szumoilációt követően a sejtmagban halmozódnak fel az S-fázis elején [3]. Mivel a dUTPázok molekulatömege (~55 kDa) nem teszi lehetővé a magba való passzív bejutását, tisztázásra vár, hogy miként, és milyen szabályozással jutnak be a sejtmagba. A 40 kDa-nál nagyobb makromolekulák magi transzport folyamatai a karioferin fehérjecsald révén valósulnak meg, melyek specifikus lineáris motívumokat ismernek fel a szállítandó fehérjéken. Ezeket a szegmenseket nukleáris lokalizációs vagy nukleáris export szignálnak nevezzük (NLS illetve NES) [4]. A magi transzport folyamatok számos szinten szigorúan szabályozottak annak érdekében, hogy a különböző celluláris folyamatokat minél hatékonyabban vezényelhessék. A szabályozás egyik jellegzetes módja NLS közeli foszforiláción keresztül valósul meg, amely gátolhatja vagy éppen serkentheti a magi transzportot [5]. Mivel a magi import dinamikáját elsősorban az importinok és a szállítandó fehérje közti affinitáson múlik, így sok esetben a foszforiláció közvetlenül ennek modulálásán keresztül fejti ki hatását [6]. A humán dUTPáz magi izoformájának NLS-ének közelében *in vivo* foszforilálódik. Egy hipofoszforilációt mimikáló alanin mutáció azonban nem volt hatással a fehérje lokalizációjára, aktivitására, vagy feltekeredésére [7]. Ebben az esetben szükségeszerű egy hiperfoszforilációt mimikáló glutaminsav mutáns vizsgálata is. A dUTPázok tipikusan homotrimer fehérjék, ami azt jelenti, hogy a magi izoforma három NLS-el rendelkezik. Ez idáig nem ismert, hogy ez a tulajdonságuk szükségeszerű-e a helyes intracelluláris eloszlás kialakításához.

2. Célkitűzések

A gerincesek dUTPázai szigorúan abba a két kompartmentumba kerülnek, amelyekben DNS szintézis zajlik, a sejtmagba és a mitokondriumokba. Célunk volt, hogy a dUTPáz magi transzportjának mechanizmusát és esetleges regulációját jobban megismerjük. Szintúgy meg kívántuk vizsgálni, hogy vajon más folyamat limitálhatja-e a dUTPáz magi jelenlétét.

2.1 A *D. melanogaster* dUTPáz in vivo kalpain szubsztrátnak bizonyult [8]. Ennek tükrében meg kívántuk vizsgálni, hogy vajon a humán dUTPáz is kalpain szubsztrát-e, hiszen amennyiben igen, az kihathat a dUTPáz elérhetőségére, ami felboríthatja a dNTP készletek helyes arányát és mennyiségét.

2.2 A humán dUTPáz magi izoformájáról ismert, hogy foszforilálódik az NLS közeli S11-es pozícióban, feltehetőleg a Cdk1-es kináz által [9].

2.2.1 Meg kívántuk vizsgálni ennek hatását a dUTPáz intracelluláris eloszlására egy glutaminsav pontmutánssal (S11E) illetve annak izosztérikus kontrolljával egy glutamin pontmutációval (S11Q).

2.2.2 A dUTPáz NLS összetétele alapján várható, hogy az a klasszikus magi import útvonallal jut a sejtmagba, az importin- α adaptor fehérje segítségével. Ezt a feltételezett kölcsönhatást a két fehérje között meg kívántuk vizsgálni különböző biofizikai módszerekkel, illetve azt is, hogy vajon a foszforilációnak van-e erre valamilyen hatása.

2.2.3 A Cdk1-es kináz által szabályozott magi transzport folyamatokról készült élesztőben egy szisztematikus bioinformatikai lekeresés, amely számos új, sejtciklus függő lokalizációjú fehérjét jellemzett [10]. Hasonló lekeresést szerettünk volna elvégezni a humán proteómon is, kombinálva különböző *in silico* szűrési eljárásokat, nagy áteresztőképességű kísérletes validációval.

2.3 A dUTPázok egyik konzervált tulajdonsága, hogy homotrimer fehérjék. Ennek következménye, hogy a magi izoforma három NLS-el rendelkezik. Meg kívántuk vizsgálni, hogy az NLS kópiaszám miként járul hozzá a fehérjére jellemző intracelluláris lokalizáció kialakításában. Erre jó lehetőséget biztosít a *D. virilis* dUTPáza, amely egyetlen polipeptid láncból alakítja ki a homotrimer jellegű szerkezetet, viszont csupán egy NLS-t hordoz. Ezen eredmények betekintést adhatnak arról, hogy az NLS kópiaszám általánosságban miként befolyásolhatja a magi transzport folyamatokat.

3. Alkalmazott technikák

Annak érdekében, hogy a **2.1** pontban feltett kérdésekre választ kapjunk, m-kalpait és a humán dUTPáz magi izoformáját rekombináns DNS technológiával *E.coli*-ban termeltük, és abból affinitás kromatográfiával tisztítottunk. A kalpain általi hasítást in vitro emésztéssel teszteltük. A hasítási pozíciókat tömegspektrometriával állapítottuk meg. Western blottal követtük nyomon az ionomycin által aktivált kalpainok hatását HeLa sejtek dUTPáz készletére.

A **2.2.1** pontban foglalt céljaink elérésének érdekében a dUTPázt a DsRed nevű fluoreszcens fehérjéhez fuzionáltattuk egyben létrehoztuk a két pontmutánst (S11E és S11Q). A lokalizációjukat konfokális mikroszkópiával vizsgáltuk. A foszforiláció sejtciklusbeli idejét immunocitokémiai eljárással vizsgáltuk egy dUTPáz foszfo-NLS specifikus antitesttel. Az eloszlás sejtciklus függő dinamikáját video mikroszkópiával követtük.

A **2.2.2** pontban foglaltak vizsgálatához tisztított dUTPáz és importin- α komplex képzési folyamatait vizsgáltuk natív gélelektroforézissel, analitikai géliszűréssel, cirkuláris dikroizmussal és izotermális titráló mikrokolorimetriával. A dUTPáz NLS:importin- α szerkezetét röntgen krisztallográfiával határoztuk meg.

A **2.2.3** pontban foglaltak értelmében a humán proteómot olyan NLS tartalmú fehérjékre szűrtünk (NucImport programmal), amelyek NLS-ének közelében egy Cdk1 kináz konszenzus hely található (Predikin programmal) a P0 és P-1 pozícióban. Gén ontológiát használtunk a találataink osztályozására, és számos találatot kísérletiesen is validáltunk egy NLS aktivitás detektálásra alkalmas konstrukttal.

A **2.3** pontban foglalt kérdéseink megválaszolása végett megvizsgáltuk, hogy a *D. virilis* valóban csak a feltételezett egyetlen polipeptid láncból álló dUTPáz izoformával rendelkezik, mind mRNS (5' RACE technikával) és fehérje szinten (western blottal). Az egyes dUTPáz formák lokalizációs mintázatának összehasonlítását az tette lehetővé, hogy a fehérjéket EGFPhez vagy AU1-jelhez fuzionáltuk. Az NLS kópiaszám hatását tehát konfokális mikroszkóppal lehetett kiértékelni. A lokalizációs mintázatot mind rovar, mind pedig emlős sejtvonalakon elvégeztük. Az endogén dUTPáz készlet eloszlását mindkét *Drosophila* fajtól származó szövetekben és sejtvonalakon teszteltük immunocitokémiai eljárással. A különböző NLS számmal rendelkező dUTPáz variánsok és az importin- α közti kölcsönhatás tanulmányozását natív gélelektroforézissel, analitikai géliszűréssel és izotermális titráló mikrokolorimetriával végeztük.

4. Eredmények és következtetések

A 2.1 pont tézisei: (cf. Bozoky Z., Róna G., et al., 2011 *PlosOne*)

- A dUTPáz magi izoformáját részlegesen emésztí az m-kalpain *in vitro*.
- A kalpain hasítási helyek a dUTPáz N-terminális végén találhatóak, a következő pozíciók között: ⁴SE⁵; ⁷TP⁸; ³¹LS³², amelyek tömegspektrometriával lettek meghatározva.
- A kalpain hasítás kalcium függő, és a szubsztrát analóg α,β -imino-dUTP nem védi meg a hasítástól a dUTPáz.
- A kalpain hasítás nincs hatással a dUTPáz katalitikus aktivitására.
- A ³¹LS³² pozícióban történő hasítás esetén a dUTPázról levágódik annak NLS-e, amely kihathat az enzim lokalizációjára.
- Ionomycin hatására a HeLa sejtekben a dUTPáz készlet degradálódik 24 órával a kezelést követően.

A 2.2.1 pont tézisei: (cf. Róna G., et al., 2013 *Acta D.*; Róna G., et al., 2014 *Cell Cycle*)

- Az S11 pozícióba bevitt glutaminsav (Glu) hatására az enzim kizárólag a citoplazmában lesz megtalálható. Ez a mutáció (S11E) egy állandó jellegű foszforilációt mimikál. A vad típusú fehérje, csakúgy mint az S11Q mutáns (izoszférikus kontroll, nincs töltése, nem foszforilálható) elsősorban magi elhelyezkedésű. Ez a lokalizációs mintázat számos különböző genetikai háttérű sejtvonalban azonos (MCF-7, COS7, HeLa, NIH-3T3 and 293T).
- A leptomycin B, ami a CRM1 inhibitora, nincs hatással az S11E mutáns citoplazmatikus feldúsulására, tehát feltételezetően a mutáns lokalizációját nem felgyorsult magi export folyamatok okozzák.
- Az S11-es pozíció foszforilációja a sejtciklus G2/M fázisára tehető. A foszfo-NLS specifikus dUTPáz antitest festése egybeesik az M-fázis marker, foszfo-S10 hiszton H3 markerrel.
- 293T sejteken végzett video mikroszkópos megfigyelések alapján az osztódást követően a vad típusú dUTPáz magi felhalmozódása csak időben késleltetve (~200 perc múltán) indul meg. Ezzel ellentétben az S11Q mutáns magi felhalmozódása osztódást követően rögtön megindul. Ugyanakkor, ha már megindult a magi import, a két fehérjének hasonló a magi import kinetikája. Western blottok tanulsága alapján a DsRed-el ellátott vad típusú dUTPáz azonos módon foszforilálódik, mint az endogén forma.

A 2.2.2 pont tézisei: (cf. Róna G., et al., 2013 *Acta D.*)

- Analitikai gélszűrés során látható, hogy a vad típusú dUTPáz:importin- α keverékében egy magasabb molekulásúlyú komponens is megjelenik, mint a csak önállóan lennének a fehérjék futtatva. Ez lehetséges komplex formálódásra enged következtetni. Az S11E mutáns esetén is megfigyelhető egy magasabb molekulásúlyú komponens, de ez később eluálódik, mint a vad típus esetén megfigyelhető lehetséges komplex. A kevésbé stabil S11E dUTPáz:importin- α komplex esetén valószínűleg eltérő dinamikus egyensúlyi áll fenn a komplex és a különálló alkotók között, mely az utóbbiak felé van eltolva.
- Natív gélelektroforézissel kimutatható a vad típusú és az S11Q mutáns dUTPáz importin- α -val alkotott komplexe, amely a gélen egy új pozícióban jelenik meg. Hasonló komplex létrejöttét az S11E mutáns esetén nem mutattunk ki.
- Az importin- α -t a dUTPázal kialakított kölcsönhatás stabilizálja a hő hatására bekövetkező denaturációval szemben. A denaturáció során végbemenő letekeredés jellege is kooperatívabb. A hőmérséklet által indukált letekerődést cirkuláris dikroizmussal követtük 210 nm-en. Az importin- α stabilizációja megfigyelhető a vad típusú dUTPázal (eltolódás 35.7 °C-ról 43.6 °C-ra) és az S11Q mutáns dUTPáz esetében (eltolódás 35.7 °C-ról 44.4 °C-ra) de nem tapasztaltunk hőmérsékletbeli eltolódást az S11E mutáns esetén.
- Izotermális titráló mikroklorimetriát használtunk a komplexek K_d értékeinek meghatározására, valamint hogy a komplex sztöchiometriájáról is adatot nyerjünk. A disszociációs állandó egy nagyságrenddel különbözött az S11E mutáns és a vad típusú, valamint az S11Q mutáns között (a K_d rendre 0.79 μ M, 0.76 μ M és 9.62 μ M a vad típusú, S11Q and S11E mutáns dUTPázok esetén). Az általunk meghatározott sztöchiometria egy olyan modellt támogat, amely szerint ideális körülmények között minden NLS-t köthet egy importin- α molekula.
- A kölcsönhatás szerkezeti háttéréről az importin- α és a dUTPáz NLS peptidek kristályszerkezete adott felvilágosítást. Az S11E mutáns másképp fekszik bele az importin- α NLS kötő árkába, amely számos fontos kölcsönhatási pont elvesztésével jár az NLS peptid és az importin- α felszíne között. Mindez az S11E NLS gyengébb kötődéséhez vezet.

A 2.2.3 pont tézisei: (cf. Róna G., et al., 2014 *Cell Cycle*)

- Az *in silico* vizsgálatok, melyek célja az volt, hogy a humán proteomban találjunk olyan Cdk1 konszenzus helyeket, melyek egybeesnek NLS-ek P0 vagy P-1-es pozícióival, végül rendre 50 és 22 találatot hoztak.
- Gén ontológiával történő elemzés során, a találataink között számos olyan fehérje lelhető fel amely, kitüntetett szerepet játszik a DNS károsodások felismerésében és javításában, génexpresszió szabályozásában, epigenetikában, RNS processzálasban, sejtciklus szabályozásában.
- 13 találatot kísérletesen is igazoltuk az NLS aktivitás detektálásra alkalmas szenzorunkkal. A lokalizációs adatok azt mutatták, hogy valamennyi esetben, ahol a Ser vagy Thr pozíciókat (akár P0 vagy P-1 hely) Glu-al helyettesítettük (ezek a Cdk1 konszenzus helyek) mindig gyengébb magi felhalmozódást kaptunk, ha a fehérjék vad típusú NLS-ével hasonlítjuk össze az eredményeket.
- Az Swi6 NLS-én végzett „glutamin sav pásztázás” tanulságai alapján egy foszforiláció a P0 és a P-1-es pozícióból gyengíti az NLS-t míg a P-2-es pozícióból erősíti annak hatását. Ezen megfigyelések összhangban vannak az importin- α -t célzó specifikus peptid alapú inhibitorok szekvenciájával.
- Ismert Cdk1 szubsztrátok foszforilációs helyei : UNG2 (S14), UBA1 (S4) and p53 (S315) a P-2-es pozícióba esnek, így feltételezhetően ez a foszforiláció elősegíti ezen fehérjék magi akkumulációját az osztódást követően.
- Feltételezésünk szerint a Cdk1 kináznak kitüntetett szerepe van a magi proteom kialakításában az osztódást követően, azáltal, hogy bizonyos fehérjék magi transzportját gátolja (NLS P0 és P-1 pozíció foszforilálása) míg másokét serkenti (NLS P-2 pozíció foszforilálása).

A 2.3 pont tézisei: (cf. Róna G., et al., 2014 *Febs J.*)

- Kísérletesen bizonyítottuk, hogy a *D. virilis* egyetlen dUTPáz izoformával (ABC-ne elnevezve) rendelkezik, melyről mind mRNS szinten (5'RACE technikával), mind fehérje szinten (western blotokkal) megbizonyosodtunk. A dUTPázt kódoló gén háromszoros kópiában van jelen egyetlen leolvasási keretben, ami egy polipeptid láncként íródik át. A három domén nem teljesen azonos, és egy általunk „pseudo-heterotrimer”-nek nevezett szerkezetet vesz fel, amely mindössze egy NLS-el rendelkezik.
- Létrehoztunk egy mesterséges dUTPáz formát (egy „AAA”-nak nevezett homotrimer fehérjét), amely három NLS-el rendelkezik. Az EGFP-vel vagy AU1-el fuzionáltatott AAA

és ABC formák lokalizációját hasonlítottuk össze egymással és a *D. melanogaster* dUTPázaival. Az AAA forma kizárólag a sejtmagba lokalizál, amíg az ABC forma a citoplazmában is megtalálható. Azonos eredményeket kaptunk mind EGFP-vel, mind pedig az AU1 epitóppal, illetve összevethető az eloszlási mintázat akár rovar sejtenyészeten vizsgáltuk, akár emlős sejteken (293T, HeLa, COS7).

- Mind a *D. melanogaster* és a *D. virilis* (sejtvonalakban és szövetekben) endogén dUTPáz készlete megtalálható a sejtmagban és a citoplazmában is. Ugyanakkor *D. melanogaster* esetén ezt a lokalizációs mintázatot két különálló izoforma alakítja ki, míg *D. virilis* esetén csupán egy dUTPáz izoforma.
- Analitikai gélszűréssel és natív gélelektroforézissel is kimutatható mind az AAA, mind az ABC dUTPázok komplex képződése importin- α -val. Az importin- α -nak a két dUTPázzal alkotott komplexének futási karaktere azonban eltérő. Az AAA dUTPáz:importin- α komplexnek hamarabb jelenik meg az elúciós csúcsa, ami magasabb molekulatömegre enged következtetni. Emellett az AAA dUTPáz:importin- α komplex kromatogramja aszimmetrikus, amely több különböző összetételű komplex jelenlétét sejteti.
- Izotermális titráló mikrokolorimetriával nyertünk kvantitatív információkat a komplexekről. Az adatok tükrében valószínűsíthető, hogy ideális körülmények között minden NLS képes importin- α -t kötni, így az ABC dUTPáz egyet, míg az AAA forma mindösszesen hármat. Olyan dUTPázok mutánsok esetén, ahol eltávolítottuk azok NLS-ét (Δ NLS-AAA and Δ NLS-ABC) nem találtunk komplex képződést importin- α -val.
- Mivel a két dUTPáz (AAA és ABC formák) importin- α -val alkotott komplexeinek K_d értéke hasonlóak, az eltérő lokalizációs mintázatuk valószínűleg annak köszönhető, hogy az AAA forma három NLS-el nagyobb hatékonysággal tud versenyezni importin- α -ért a sejtes milióban. Tehát az NLS kópiaszám jelentős mértékben hozzájárulhat a magi transzport folyamatok szabályozásához az NLS-ek affinitása mellett.

5. Referenciák:

1. Vertessy, B.G. and J. Toth, *Keeping uracil out of DNA: physiological role, structure and catalytic mechanism of dUTPases*. Acc Chem Res, 2009. **42**(1): p. 97-106.
2. Merenyi, G., J. Kovari, J. Toth, E. Takacs, I. Zagyva, A. Erdei, and B.G. Vertessy, *Cellular response to efficient dUTPase RNAi silencing in stable HeLa cell lines perturbs expression levels of genes involved in thymidylate metabolism*. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2011. **30**(6): p. 369-90.
3. MacFarlane, A.J., D.D. Anderson, P. Flodby, C.A. Perry, R.H. Allen, S.P. Stabler, and P.J. Stover, *Nuclear localization of de novo thymidylate biosynthesis pathway is*

- required to prevent uracil accumulation in DNA.* J Biol Chem, 2011. **286**(51): p. 44015-22.
4. Gorlich, D. and U. Kutay, *Transport between the cell nucleus and the cytoplasm.* Annu Rev Cell Dev Biol, 1999. **15**: p. 607-60.
 5. Pouton, C.W., K.M. Wagstaff, D.M. Roth, G.W. Moseley, and D.A. Jans, *Targeted delivery to the nucleus.* Adv Drug Deliv Rev, 2007. **59**(8): p. 698-717.
 6. Hodel, A.E., M.T. Harreman, K.F. Pulliam, M.E. Harben, J.S. Holmes, M.R. Hodel, K.M. Berland, and A.H. Corbett, *Nuclear localization signal receptor affinity correlates with in vivo localization in Saccharomyces cerevisiae.* J Biol Chem, 2006. **281**(33): p. 23545-56.
 7. Tinkelenberg, B.A., W. Fazzone, F.J. Lynch, and R.D. Ladner, *Identification of sequence determinants of human nuclear dUTPase isoform localization.* Exp Cell Res, 2003. **287**(1): p. 39-46.
 8. Bozoky, Z., A. Alexa, J. Dancsok, G. Gogl, E. Klement, K.F. Medzihradszky, and P. Friedrich, *Identifying calpain substrates in intact S2 cells of Drosophila.* Arch Biochem Biophys, 2009. **481**(2): p. 219-25.
 9. Ladner, R.D., S.A. Carr, M.J. Huddleston, D.E. McNulty, and S.J. Caradonna, *Identification of a consensus cyclin-dependent kinase phosphorylation site unique to the nuclear form of human deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase.* J Biol Chem, 1996. **271**(13): p. 7752-7.
 10. Kosugi, S., M. Hasebe, M. Tomita, and H. Yanagawa, *Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(25): p. 10171-6.

6. PEER-REVIEWED PUBLICATIONS RELATED TO THE DOCTORAL THESIS

- 2014 Róna, G.,** H.L. Palinkas, M. Borsos, A. Horvath, I. Scheer, A. Benedek, G.N. Nagy, I. Zagyva, and B.G. Vertessy,
NLS copy-number variation governs efficiency of nuclear import--case study on dUTPases. *FEBS J*, 2014. 281(24): p. 5463-78., IF: 3.99
- 2014 Róna, G.,** M. Borsos, J.J. Ellis, A.M. Mehdi, M. Christie, Z. Kornyei, M. Neubrandt, J. Toth, Z. Bozoky, L. Buday, E. Madarasz, M. Boden, B. Kobe, and B.G. Vertessy
Dynamics of re-constitution of the human nuclear proteome after cell division is regulated by NLS-adjacent phosphorylation, *Cell Cycle*, 2014. 13(22): p. 3551-64., IF: 5.24
- 2013 Róna, G.,** M. Marfori, M. Borsos, I. Scheer, E. Takacs, J. Toth, F. Babos, A. Magyar, A. Erdei, Z. Bozoky, L. Buday, B. Kobe, and B.G. Vertessy,
Phosphorylation adjacent to the nuclear localization signal of human dUTPase abolishes nuclear import: structural and mechanistic insights. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2013. 69(Pt 12): p. 2495-505., IF: 7.23
- 2011 Bozoky Z*, Róna G*,** Klement E, Medzihradszky KF, Merenyi G, Vertessy BG & Friedrich P.
Calpain-catalyzed proteolysis of human dUTPase specifically removes the nuclear localization signal peptide. *PLoS One* 6(5): p. e19546., IF: 3.53
*equal contribution

7. OTHER PEER-REVIEWED PUBLICATIONS

- 2014 Szabo, J.E.,** V. Nemeth, V. Papp-Kadar, K. Nyiri, I. Leveles, A.A. Bendes, I. Zagyva, **G. Róna,** H.L. Palinkas, B. Besztercei, O. Ozohanics, K. Vekey, K. Liliom, J. Toth, and B.G. Vertessy,

Highly potent dUTPase inhibition by a bacterial repressor protein reveals a novel mechanism for gene expression control. *Nucleic Acids Res*, 2014. 42(19): p. 11912-20., IF: 8.81

- 2013** Leveles, I., Nemeth, V., Szabo, J.E., Harmat, V., Nyiri, K., Bendes, A.A., Papp-Kadar, V., Zagyva, I., **Róna, G.**, Ozohanics, O., et al.
Structure and enzymatic mechanism of a moonlighting dUTPase. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* 69, 2298-2308., IF: 7.23
- 2013** Chiş L, Hriscu M, Bica A, Toşa M, Nagy G, **Róna G**, G Vértessy B, Dan Irimie F
Molecular cloning and characterization of a thermostable esterase/lipase produced by a novel *Anoxybacillus flavithermus* strain. *J Gen Appl Microbiol.* 59, 119-34., IF: 0.74
- 2012** D. Beke, Zs. Szekrényes, D. Pálfi, **G. Róna**, I. Balogh, P. Maák, G. Katona, Zs. Czigány, K. Kamarás, B. Rózsa, L. Buday, B. Vértessy, and A. Gali
Silicon carbide quantum dots for bioimaging. *Journal of Materials Research*, DOI: 10.1557/jmr.2012.296, IF: 1.82
- 2012** Muha, V., Horvath, A., Bekesi, A., Pukancsik, M., Hodoscsek, B., Merenyi, G., **Róna, G.**, Batki, J., Kiss, I., Jankovics, F., Vilmos P, Erdelyi M, Vértessy BG
Uracil-containing DNA in *Drosophila*: stability, stage-specific accumulation, and developmental involvement. *PLoS Genetics* 8, e1002738, IF: 8.17
- 2011** Leveles I, **Róna G**, Zagyva I, Bendes A, Harmat V & Vértessy BG
Crystallization and preliminary crystallographic analysis of dUTPase from the phi11 helper phage of *Staphylococcus aureus*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 67, 1411-1413, IF: 0.57
- 2008** Kiss R, Bozoky Z, Kovacs D, **Róna G**, Friedrich P, Dvortsak P, Weisemann R, Tompa P & Perczel A
Calcium-induced tripartite binding of intrinsically disordered calpastatin to its cognate enzyme, calpain. *FEBS Lett* 582, 2149-54., IF: 3.34

8. PUBLICATIONS IN PRESS AT PEER-REVIEWED JOURNALS

- 2015** Horváth, András; Batki, Júlia; Henn, László; Lukacsovich, Tamás; **Róna, Gergely**; Erdélyi, Miklós; Vértessy, Beáta
dUTPase expression correlates with cell division potential in *Drosophila melanogaster*, *FEBS J*, accepted manuscript, IF: 3.99

9. COMMENT ARTICLE AT PEER-REVIEWED JOURNALS

- 2014** **Róna, G.**, M. Borsos, B. Kobe, and B.G. Vértessy,
Factors influencing nucleo-cytoplasmic trafficking: which matter? Response to Alvisi & Jans' comment on Phosphorylation adjacent to the nuclear localization signal of human dUTPase abolishes nuclear import: structural and mechanistic insights. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2014. 70(Pt 10): p. 2777-8., IF: 7.23